

⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ Übersetzung der
europäischen Patentschrift

⑨ EP 0 746 618 B 1

⑩ DE 695 27 835 T 2

⑮ Int. Cl. 7:
C 12 N 15/55
C 12 N 9/20
C 11 D 3/386

⑰ Deutsches Aktenzeichen: 695 27 835.5
⑱ PCT-Aktenzeichen: PCT/DK95/00079
⑲ Europäisches Aktenzeichen: 95 909 666.0
⑳ PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 95/022615
㉑ PCT-Anmeldetag: 22. 2. 1995
㉒ Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: 24. 8. 1995
㉓ Erstveröffentlichung durch das EPA: 11. 12. 1996
㉔ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 21. 8. 2002
㉕ Veröffentlichungstag im Patentblatt: 10. 4. 2003

⑳ Unionspriorität:
21794 22. 02. 1994 DK

㉖ Patentinhaber:
Novozymes A/S, Bagsvaerd, DK

㉗ Vertreter:
Patent- und Rechtsanwälte Bardehle, Pagenberg,
Dost, Altenburg, Geissler, Isenbruck, 81679
München

㉘ Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, NL,
PT, SE

㉙ Erfinder:
SVENDSEN, Allan, DK-2880 Bagsvaerd, DK;
CLAUSEN, Ib Groth, DK-2880 Bagsvaerd, DK;
OKKELS, Jens Sigurd, DK-2880 Bagsvaerd, DK;
THELLERSEN, Marianne, DK-2880 Bagsvaerd, DK

㉚ METHODE ZUR HERSTELLUNG EINER VARIANTE EINES LIPOLYTISCHEN ENZYMES

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 695 27 835 T 2

BEST AVAILABLE COPY



BARDEHLE
PAGENBERG
DOST
ALTENBURG
GEISSLER

Patent- und Rechtsanwälte - Postfach 86 06 20 - 81633 München

Novozymes A/S
Attn. Mr. Sten L. Knudsen
Krogshøjvej 36

2880 Bagsvaerd
DÄNEMARK

Reference	Country
Agent	Short title
11. APR. 2003	
SLK	
Action	Term
11. APR 2003	—
Litn	

SLK 11. APR 2003

Munich, April 8, 2003

European patent 0746618
Novozymes A/S
Your ref.: 4153.205-DE
Our ref: N37410DE G/BUW/Rau

Dear Mr. Knudsen,

Please note that the German translation of the above mentioned European patent was published in the German Patent Journal on

April 10, 2003

under publication number

DE 69527835.5-08 T2

Enclosed please find the publication print.

Very truly yours,
Patent- und Rechtsanwälte

Encl.:
publication print of the German
translation of the EP-patent


Dr. Wolfgang Bublak
Patentanwalt

Dr. Wolfgang Bublak
Galileiplatz 1
81679 München
Tel. +49 (89) 92 80 5-0
Fax +49 (89) 92 80 5-444
bublak@bardehle.de
www.bardehle.com

MÜNCHEN
DUISBURG
PARIS
ALICANTE
SHANGHAI

NZAS-0018416

EP0 746 618 (95 909 666.0)
Novozymes A/S

7. November 2002
N37410DE B6/Eng/smi

GEBIET DER ERFINDUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer Variante
5 eines lipolytischen Ausgangsenzyms und Varianten, die durch das Verfahren hergestellt wurden. Weiterhin betrifft die Erfindung ein DNA-Konstrukt kodierend für eine Variante der Erfindung, einen Expressionsvektor und eine Wirtszelle, die das DNA-Konstrukt umfassen und ein Detergensadditiv oder eine Detergensen-
sammensetzung, die eine Variante umfassen.

10

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

Schon mehrere Jahre lang sind lipolytische Enzyme als Detergensenzyme benutzt
worden, d. h. um Lipid oder Fettflecken aus Kleidern und anderen Textilien zu
15 entfernen.

Zum Beispiel wurden verschiedene mikrobielle Lipasen als Detergensenzyme
vorgeschlagen. Beispiele für solche Lipasen schließen ein eine *Humicola lanu-*
ginosa Lipase, z. B. beschrieben in EP 258 068 und EP 305 216, eine *Rhizomucor*
20 *miehei* Lipase, z. B. wie beschrieben in EP 238 023, eine *Candida* Lipase, wie
eine *C. antarctica* Lipase, z. B. die *C. antarctica* Lipase A oder B, beschrieben in
EP 214 761, eine *Pseudomonas* Lipase wie eine *P. alcaligenes* und *P. pseu-*
doalcaligenes Lipase, z. B. wie beschrieben in EP 218 272, eine *P. cepacia* Lipa-
se, z. B. wie beschrieben in EP 331 376, eine *Bacillus* Lipase, z. B. eine *B. subtilis*
25 Lipase (Dartois et al., 1993), eine *B. stearothermophilus* Lipase (JP 64/744992)
und eine *B. pumilus* Lipase (EP 91 00664).

Des weiteren ist eine Anzahl von klonierten Lipasen beschrieben worden, ein-
schließlich der *Penicillium camembertii* Lipase, beschrieben von Yamaguchi, S. et

al., 1991, die *Geotricum candidum* Lipase (Schimada, Y. et al., 1989), und verschiedene *Rhizopus* Lipasen wie eine *R. delemar* Lipase (Hass, M.J et al., 1991), eine *R. niveus* Lipase (Kugimiya, W., 1992), und eine *R. oryzae* Lipase.

5 Andere Arten von lipolytischen Enzymen, die als Detergensenzyme vorgeschlagen worden sind, schließen Cutinasen mit ein, z. B. von *Pseudomonas mendocina* stammend, wie beschrieben in WO 88/09367 oder eine Cutinase von *Fusarium solani pisi* stammend (z. B. beschrieben in WO 90/09446).

10 In den letzten Jahren wurden Versuche unternommen, um Lipasevarianten herzustellen, die verbesserte Eigenschaften für Detergensezwecke haben. Z. B. beschreibt WO 92/05249 Lipasevarianten mit verbesserten Eigenschaften, wobei bestimmte Charakteristika von Wildtyp-Lipaseenzymen durch spezifische, d. h. ortsspezifische Modifikationen ihrer Aminosäuresequenzen, verändert wurden.

15 Genauer gesagt sind Lipasevarianten beschrieben, wobei ein oder mehrere Aminosäurereste der sogenannten Lipidkontaktzone der Ausgangslipase modifiziert worden ist.

20 PCT/DK93/00225 beschreibt Lipasevarianten mit verbesserten Eigenschaften, wobei ein Aminosäurerest, der eine kritische Position innerhalb der Lipase einnahm, modifiziert worden ist.

25 EP 407 225 beschreibt Lipasevarianten mit verbesserter Resistenz gegenüber proteolytischen Enzymen, die durch genau definierte Aminosäuremodifikationen hergestellt worden sind.

EP 260 105 beschreibt Hydrolasen, wobei ein Aminosäurerest innerhalb eines Bereiches von 15 Å vom aktiven Zentrum substituiert worden ist.

30 Alle oben genannten Lipasevarianten wurden durch Verwendung von ortsspezifischer Mutagenese, die in der Modifikation von spezifischen Aminosäureresten

serte Toleranz gegenüber einem Detergens oder einer oder mehrerer Detergenskomponenten, im Vergleich zum lipolytischen Ausgangsenzym, hat.

Im vorliegenden Zusammenhang soll der Begriff „lipolytisches Enzym“ ein Enzym anzeigen, das eine lipidabbauende Fähigkeit aufweist, wie die Fähigkeit, ein Triglycerid oder ein Phospholipid abzubauen. Das lipolytische Enzym kann z. B. eine Lipase sein, eine Phospholipase, eine Esterase oder eine Cutinase.

Der Begriff „Zufallsmutagenese“ soll in einer konventionellen Weise verstanden werden, d. h. die Einführung von einer oder mehreren Mutationen an zufälligen Positionen des Ausgangsenzyms anzeigen (d. h. im Gegensatz zu ortsspezifischer Mutagenese). Die zufälligen Mutationen werden typischerweise eingeführt, indem man eine große Anzahl an Kopien der DNA-Sequenz, die modifiziert werden soll, einem Mutagen aussetzt und dann auf die Gegenwart von Varianten screent. Geeignete Techniken zur Einführung von zufälligen Mutationen sind weiter unten detailliert diskutiert.

Die Kriterien für das Screening von Schritt (c) werden als von besonderem Nutzen angesehen, um Varianten von lipolytischen Ausgangsenzymen zu identifizieren, die verbesserte Wasch- und/oder Geschirrspüleigenschaften im Vergleich zu ihren Ausgangsenzymen haben.

Im vorliegenden Zusammenhang soll der Begriff „verminderte Kalziumabhängigkeit“ bedeuten, dass das mutierte lipolytische Enzym geringere Mengen Kalzium benötigt als das Ausgangsenzym, um dasselbe Maß an Aktivität zu zeigen, wenn unter ähnlichen Bedingungen getestet wird. Vorzugsweise ist das mutierte lipolytische Enzym der Erfindung im Wesentlichen unabhängig von der Gegenwart von Kalzium, um Enzymaktivität aufzuweisen.

Der Begriff „verbesserte Toleranz gegenüber einem Detergens oder einer Detergenskomponente“ soll bedeuten, dass das mutierte lipolytische Enzym bei einer

Klonierung einer DNA-Sequenz kodierend für ein lipolytisches Ausgangsenzym

- Die DNA-Sequenz kodierend für ein lipolytisches Ausgangsenzym, das in Einklang mit der vorliegenden Erfindung einer Zufallsmutagenese unterzogen werden soll, kann von jeder Zelle oder jedem Mikroorganismus, der das infragekommene Ausgangsenzym produziert, durch Verwendung durch von dem Stand der Technik bekannten Verfahren isoliert werden. Z. B. kann die DNA-Sequenz isoliert werden, indem man eine cDNA oder eine genomische Library von einem Organismus, von dem man erwartet, dass er die Sequenz enthält, etabliert, und für positive Klone mit konventionellen Methoden screenet. Beispiele für solche Methoden sind die Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden, die aufgrund der Aminosäuresequenz oder DNA-Sequenz des Ausgangsenzyms angefertigt wurden (wenn Sequenzinformation verfügbar ist) oder aufgrund eines verwandten lipolytischen Enzyms (falls Sequenzinformation für das Ausgangsenzym nicht verfügbar ist) in Übereinstimmung mit Standardtechniken (cf. Sambrook et al., 1989), und/oder die Selektion auf Klone, die lipolytische Aktivität exprimieren, wie eine Lipase und/oder die Selektion auf Klone, die ein Protein herstellen, das mit einem Antikörper reagiert, der gegen ein lipolytisches Ausgangsenzym gemacht wurde.
- 20 Eine bevorzugte Methode, um eine DNA-Sequenz aus einer cDNA oder genomischen Library zu isolieren, die für ein lipolytisches Ausgangsenzym kodiert, das erfindungsgemäß modifiziert werden soll, besteht in der Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit degenerierten Oligonukleotidsonden, die basierend auf der DNA- oder Aminosäuresequenz des Ausgangsenzyms hergestellt wurden.
- 25 Z. B. kann die PCR durchgeführt werden unter Verwendung der Techniken, die im US-Patent No. 4,683,202 oder von R. K. Saiki et al. (1988) beschrieben sind.

Alternativ dazu kann die DNA-Sequenz, die für das Ausgangsenzym kodiert, synthetisch mit etablierten Standardmethoden hergestellt werden, z. B. mit der

30 Phosphoramiditmethode, beschrieben von Beaucage and Caruthers (1981), oder der Methode beschrieben von Matthes et al. (1984). Gemäß der Phosphoramidit-

Methylhydroxylamin, salpetrige Säure, Ethylmetansulfonat (EMS), Natriumbisulfat, Ameisensäure und Nukleotidanaloga mit ein.

5 Wenn derartige Agenzien verwendet werden, wird die Mutagenese typischerweise durchgeführt, indem man die DNA-Sequenz, die für das Ausgangsenzym, das mutagenisiert werden soll, kodiert, in Gegenwart des mutagenisierenden Agens der Wahl unter Bedingungen inkubiert, die für das Stattfinden der Mutagenese geeignet sind und auf mutierte DNA, die die gewünschten Eigenschaften hat, selektiert.

10 Wenn die Mutagenese unter Verwendung eines Oligonukleotids durchgeführt wird, kann während der Synthese des Oligonukleotids an den Positionen, die man verändert haben will, das Oligonukleotid mit den drei Nicht-Ausgangsnukleotiden durch Dotierung oder durch Zusatz verändert werden (may be doped or spiked).
15 Die Veränderung durch Dotierung oder durch Zusatz (The doping or spiking) kann so vorgenommen werden, dass Codons für unerwünschte Aminosäuren vermieden werden. Das veränderte (doped or spiked) Oligonukleotid kann mit jeder veröffentlichten Technik unter Verwendung von z. B. PCR, LCR oder jeder DNA-Polymerase und Ligase in die DNA, die für das lipolytische Enzym kodiert,
20 inkorporiert werden.

Wenn PCR-vermittelte Mutagenese verwendet wird, wird entweder ein chemisch behandeltes oder unbehandeltes Gen, das für ein lipolytisches Ausgangsenzym kodiert, einer PCR unter Bedingungen unterzogen, die den Fehleinbau von Nukleotiden erhöhen (Deshler 1992, Leung et al. 1989).
25

Ein Mutatorstamm von *E. coli* (Fowler et al. 1974), *S. cerevisiae* oder jedem anderen mikrobiellen Organismus kann für die Zufallsmutagenese der DNA verwendet werden, die für das lipolytische Enzym kodiert, indem man z. B. ein
30 Plasmid, das das Ausgangsenzym enthält, in einen Mutatorstamm transformiert, den Mutatorstamm mit dem Plasmid wachsen lässt und das mutierte Plasmid aus

eine DNA-Sequenz umfassen, die für Funktionen kodiert, die die Expression der mutierten DNA-Sequenz erlauben.

Es ist zu verstehen, dass die Kriterien für das Screening, das im Schritt (c) oben
5 erwähnt ist, sorgfältig ausgewählt wurden. Darum, ohne auf irgendeine Theorie
begrenzt zu sein, glaubt man, dass das Screening nach einer verminderten Kalzi-
umabhängigkeit in Varianten resultiert, die insgesamt verbesserte Eigenschaften
haben, insoweit dass die Kalziumabhängigkeit als limitierender Faktor für opti-
male Aktivität angesehen werden kann, insbesondere unter Bedingungen, wo nur
10 geringe Mengen an freien Kalziumionen vorliegen. Im Zusammenhang mit Deter-
genslipasen werden normalerweise die benötigten freien Kalziumionen vom
Waschwasser zur Verfügung gestellt, und darum hängt die lipolytische Aktivität
vom Kalziumgehalt des Wassers ab.

15 Das Detergens oder die Detergenskomponente, dem gegenüber die Variante ver-
besserte Toleranz hat, kann von jeder beliebigen Art sein, z. B. wie weiter unten
beschrieben. Vorzugsweise ist die Detergenskomponente ein nicht-ionisches,
anionisches, kationisches, zwitterionisches oder amphoterisches Tensid. Beispiele
für nicht-ionische Tenside schließen Alkoholethoxylat ein, Beispiele für anioni-
20 sche Tenside schließen LAS, Alkylsulfat, Alkoholethoxysulfat und andere dieser
Art mit ein.

Insbesondere wird in Betracht gezogen, dass eine verbesserte Toleranz gegenüber
einem nicht-ionischen Alkoholethoxylat-Tensid, wobei ein im Handel erhältliches
25 Beispiel dafür Dobanol® ist, verbesserte Wascheigenschaften anzeigen könnte.

Das Screening von Schritt (c) wird praktischerweise durchgeführt durch Verwen-
dung eines Filterassays basierend auf dem folgenden Prinzip:

30 Ein Mikroorganismus, der in der Lage ist, das mutierte lipolytische Enzym von
Interesse zu exprimieren, wird auf einem geeigneten Medium inkubiert und unter

genszusammensetzung in Kombination mit einem der oben genannten Detektoren von enzymatischer Aktivität sein.

Es ist zu verstehen, dass die Kriterien für das Screening, die im erfindungsgemä-
5 ßen Filterassay verwendet werden, so gewählt werden können, dass sie mit den
erwünschten Eigenschaften oder Verwendungen des Enzyms, das gescreent wer-
den soll, übereinstimmen. Z. B. kann es in einem Screening nach Lipasen mit be-
sonderer Verwendung in der Papier- und Sägespanindustrie relevant sein, nach
einer Säurelipase zu screenen, die eine erhöhte Temperaturstabilität hat. Dies kann
10 durch Verwendung eines Puffers mit saurem pH (z. B. pH 4) und/oder Inkubation
bei höherer Temperatur vor oder während dem Assay durchgeführt werden.

Die im Schritt (c) produzierten Wirtszellen können weiteren Runden von Mutage-
nese, wie oben definiert in den Schritten (a) - (c), unterzogen werden, prakti-
15 scherweise indem man stringenter Kriterien für die Selektion verwendet als die
bei einer vorherigen Mutagenesebehandlung verwendeten.

Die Wirtszellen, auf die in Schritt (c) selektioniert wurde, können direkt zur Her-
stellung der Variante des lipolytischen Enzyms verwendet werden. Alternativ da-
20 zu kann die DNA, die für die Variante kodiert, von der Wirtszelle isoliert werden
und in eine andere geeignete Wirtszelle eingebracht werden, praktischerweise
unter Verwendung des Verfahrens, das weiter unten im Abschnitt mit dem Titel
„Expression einer erfindungsgemäßen Variante“ beschrieben ist, wobei geeignete
Wirtszellen auch aufgeführt sind.

25

30 **Lokalisierte Zufallsmutagenese**

Bei allen bislang kristallisierten Lipasen hat man gefunden, dass sie zumindest eine oberflächliche Schleifenstruktur (loop structure) umfassen (auch als ein Dekkel oder eine Klappe bezeichnet), die das aktive Zentrum bedeckt, wenn die Lipase in ihrer inaktiven Form ist (ein Beispiel für eine solche Lipase ist in Bardy et al., 1990, beschrieben). Wenn die Lipase aktiviert ist, wird die Schleifenstruktur verschoben, um die Reste des aktiven Zentrums zu exponieren, und eine hydrophobe Oberfläche, die das Serin des aktiven Zentrums umgibt, wird erzeugt, die eine erhöhte Oberflächenhydrophobizität hat und die mit dem Lipidsubstrat bei oder während der Hydrolyse wechselwirkt. Diese Aktivierung wird „interfaciale Aktivierung“ genannt und wird von Tilbeurgh et al. (1993) weiter diskutiert.

Für den vorliegenden Zweck wird die bei Aktivierung erschaffene Oberfläche als „Lipidkontaktzone“ bezeichnet und soll Aminosäurereste einschließen, die innerhalb liegen oder Teil dieser Oberfläche bilden, wahlweise in der Form von Schleifenstrukturen. Diese Reste können an einer Wechselwirkung der Lipase mit dem Substrat bei oder während der Hydrolyse teilnehmen, wobei die Lipase Triglyceride der Lipidphase hydrolysiert, wenn sie durch Kontakt mit der Lipidoberfläche aktiviert ist.

Die Lipidkontaktzone enthält eine Bindungsgegend für das Lipidsubstrat, wobei das der Teil der Lipidkontaktzone ist, an den das einzelne Lipidsubstratmolekül vor der Hydrolyse bindet. Diese Bindungsgegend wiederum enthält eine Acylbindende hydrophobe Spalte und eine sogenannte Hydrolysetasche, die sich in der Gegend um das Serin des aktiven Zentrums herum befindet, und in der die Hydrolyse des Lipidsubstrats angeblich stattfinden soll. Bei allen heute bekannten Lipasen ist die Lipidkontaktzone leicht zu erkennen, z. B. aus einer dreidimensionalen Struktur der Lipase, die durch geeignete Computerprogramme erzeugt wird. Die Konformation einer inaktiven bzw. einer aktiven Lipase ist in den Figuren 1 und 2 von WO 92/05249 gezeigt.

30

Die Oberflächenzugänglichkeit eines jeden Restes wird unter Verwendung des Connollyprogramms berechnet.

Vorzugsweise wird die lokalisierte Zufallsmutagenese durchgeführt an einem Teil
 5 der DNA-Sequenz, der für eine Deckelregion und/oder eine hydrophobe Spalte
 der Ausgangslipase kodiert, oder einen Teil dieser Deckel-Region und/oder hydrophoben Bindungsspalte.

Das lipolytische Ausgangsenzym, das erfindungsgemäß modifiziert werden soll,
 10 kann jeden beliebigen Ursprung haben. Das bedeutet, dass das Enzym Säuger-,
 Pflanzen-, Wirbeltier- oder jeden anderen Ursprung haben kann. Allerdings ist es
 gegenwärtig bevorzugt, dass das Enzym von mikrobiellem Ursprung ist, insofern
 eine Anzahl von mikrobiellen Stämmen gefunden wurden, die Enzyme von besonderem Nutzen für Detergense Zwecke produzieren.

15 Insbesondere kann die DNA-Sequenz des lipolytischen Ausgangsenzyms von
 einem Pilz erhältlich sein, d. h. einer Hefe oder einem filamentösen Pilz. Z. B.
 kann die DNA-Sequenz eine solche sein, die von einem Stamm von *Humicola* sp.,
 z. B. *H. Lanuginosa* erhältlich ist, von einem Stamm von *Rhizomucor* sp., z. B.
 20 *Rh. miehei*, von einem Stamm von *Rhizopus* sp., von einem Stamm von *Candida*
sp., von einem Stamm von *Fusarium* sp., z. B. *F. solani pisi*, von einem Stamm
 von *Venturia* spp., z. B. *V. inaequalis*, von einem Stamm von *Colletotrichum* spp.,
 z. B. *C. gloeosporioides*, oder *C. lagenarium*, oder von einem Stamm von *Penicillium*
spp., z. B. *P. spinulosum* oder *P. camembertii*.

25 Im vorliegenden Zusammenhang soll „erhältlich sein von“ nicht nur ein Enzym,
 das von einem Stamm des fraglichen Organismus produziert wird, bedeuten, sondern
 auch ein Enzym kodiert von einer DNA-Sequenz, die von einem solchen
 Stamm isoliert wurde, und das in einem Wirtsorganismus produziert wurde, der
 30 mit besagter DNA-Sequenz transformiert wurde. Des weiteren soll der Begriff ein
 Enzym bedeuten, das von einer DNA-Sequenz synthetischen und/oder cDNA-

Varianten der Erfindung

- 5 Um den Bezug zu erleichtern, werden verschiedene Varianten der Erfindung beschrieben unter Verwendung der folgenden Nomenklatur:

Original Aminosäure(n):Position(en):Substituierte Aminosäure(n)

- 10 Gemäß dieser Nomenklatur ist z. B. die Substitution von Aspartat durch Valin in Position 96 angegeben als:

Asp 96 Val oder D96V

Eine Deletion von Aspartat an derselben Position ist angegeben als:

Asp 96 * oder D96*

- 15 und die Insertion eines zusätzlichen Aminosäurerests, wie Lysin, ist angegeben als:

Asp 96 ValLys oder D96VK

Multiple Mutationen sind mit Pluszeichen getrennt, d. h.:

- 20 Asp 96 Val + Glu 87 Lys oder D96V + E87K

repräsentieren Mutationen an den Positionen 96 und 87, die Aspartat und Glutamat mit Valin bzw. Lysin substituieren.

Wenn eine oder mehrere alternative Aminosäurereste an einer bestimmten Position inseriert werden können, so ist das angegeben als

- 25 D96V,N oder
D96V oder D96N

- 30 Des weiteren, wenn hier eine zur Modifikation geeignete Position angegeben wird, ohne dass irgendeine spezielle Modifikation vorgeschlagen ist, ist es zu verstehen, dass jeder beliebige Aminosäurerest den Aminosäurerest, der an dieser

- N94K+D96A
 S83T+N94K+D96N
 E87K+D96V
 E87K+G91A+D96A
 5 N94K+F95L+D96H
 F95C+D96N
 E87K+G91A+D96R+I100V
 E87K+G91A
 S83T+E87K+Q249R
 10 S83T+E87K+W89G+G91A+N94K+D96V
 N73D+S85T+E87K+G91A+N94K+D94A
 E87K+G91A+L93I+N94K+D96A
 D167G+E210V
 N73D+E87K+G91A+N94I+D96G
 15 S83T+E87K+G91A+N92H+N94K+D96M
 E56R+D57L+V60M+D62N+S83T+D96P+D102E
 D57G+N94K+K96L+L97M
 E87K+G91A+D96R+I100V+E129K+K237M+I252L+P256T+G263A+L264Q
 E56R+D57G+S58F+D62C+T64R+E87G+G91A+F95L+D96P+K98I+K237M
 20 D167G
 N73D+E87K+G91A+N94I+D96G
 N251W+D254W+T267W
 S83T+E87K+G91A+N92H+N94K+D96M
 D57G+N94K+D96L+L97M
 25
 Man hat gefunden, dass diese Varianten eine verminderte Kalziumwiderstandsfähigkeit und/oder eine verbesserte Toleranz gegenüber Detergenskomponenten, wie das nicht-ionische Tensid Alkoholethoxylat, aufweisen, und sie werden, dementsprechend, als von besonderem Nutzen für Detergens- oder Geschirrspülzwecke angesehen. Die Varianten wurden mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erzeugt und anschließend dahingehend charakterisiert, welche Mutationen eingefügt
- 30

transkriptionelle Aktivität in der gewählten Wirtszelle zeigt und kann von Genen stammen, die für Proteine kodieren, die entweder homolog oder heterolog zur Wirtszelle sind. Beispiele für geeignete Promotoren, um die Transkription der DNA-Sequenz, die für die erfindungsgemäße Variante kodiert, zu veranlassen, speziell in einem bakteriellen Wirt, sind der Promotor des Lac-Operon von *E. coli*, die Promotoren des Agarasegens *dagA* von *Streptomyces coelicolor*, die Promotoren des α -Amylasegens (*amyL*) von *Bacillus licheniformis*, z. B. wie beschrieben in WO 93/10249 die Promotoren des maltogenen Amylasegens (*amyM*) von *Bacillus stearothermophilus*, die Promotoren der α -Amylase (*amyQ*) von *Bacillus amyloliquefaciens*, die Promotoren der Gene *xylA* und *xylB* von *Bacillus subtilis* etc. Beispiele für nützliche Promotoren zur Transkription in einem Pilz als Wirt sind die, die vom Gen, das die TAKA-Amylase von *A. oryzae* kodiert, stammen, von der Aspart-Proteinase von *Rhizomucor miehei*, von der neutralen α -Amylase von *A. niger*, von der säurestabilen α -Amylase von *A. niger*, von der Glucoamylase von *A. niger*, von der Lipase von *Rhizomucor miehei*, von der alkalischen Protease von *A. oryzae*, von Triose-Phosphat-Isomerase von *A. oryzae* oder von der Acetamidase von *A. nidulans*.

Der erfindungsgemäße Expressionsvektor kann auch einen geeigneten Transkriptionsterminator umfassen und, bei Eukaryoten, Sequenzen zur Polyadenylierung, die operabel mit der DNA-Sequenz, die eine erfindungsgemäße Variante kodiert, verbunden sind. Sequenzen für die Termination und Polyadenylierung können passenderweise von denselben Quellen stammen wie der Promotor.

Der Vektor kann weiterhin eine DNA-Sequenz umfassen, die den Vektor befähigt, in der fraglichen Wirtszelle zu replizieren. Beispiele für solche Sequenzen sind die origins of replication der Plasmide pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 und pIJ702.

Der Vektor kann auch einen Selektionsmarker umfassen, z. B. ein Gen, dessen Produkt einen Defekt in der Wirtszelle komplementiert, wie die *dal*-Gene aus

durchgeführt werden, z. B. mit homologer oder heterologer Rekombination. Alternativ dazu kann die Zelle mit einem Expressionsvektor transformiert werden, wie weiter unten im Zusammenhang mit den verschiedenen Wirtszelltypen beschrieben.

5

Die erfindungsgemäße Zelle kann eine Zelle eines höheren Organismus, wie eines Säugetiers oder eines Insekts, sein, ist aber bevorzugt eine mikrobielle Zelle, z. B. eine bakterielle oder eine Pilzzelle (einschließlich Hefe).

- 10 Beispiele für geeignete Bakterien sind grampositive Bakterien wie *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, oder *Streptomyces lividans* oder *Streptomyces murinus* oder gramnegative Bakte-
- 15 rien wie *E. coli*. Die Transformation der Bakterien kann, z. B., durch Protoplastentransformation erreicht werden oder unter Verwendung von kompetenten Zellen in einer Art und Weise, die per se bekannt ist.

- Der Hefeorganismus kann vorzugsweise aus einer Spezies von *Saccharomyces* oder *Schizosaccharomyces* ausgewählt sein, z. B. *Saccharomyces cerevisiae*. Der filamentöse Pilz kann vorteilhafterweise zu einer Spezies von *Aspergillus* gehören, z. B. *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* oder *Aspergillus nidulans*. Pilzzellen können durch ein Verfahren transformiert werden, das die Bildung von Protoplasten und die Transformation der Protoplasten, gefolgt von einer Regene-
- 20 ration der Zellwand, einschließt, in einer Art und Weise, die per se bekannt ist. Ein geeignetes Verfahren zur Transformation von *Aspergillus*-Wirtszellen ist in EP 238 023 beschrieben.

- In noch einem weiteren Aspekt bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein
- 30 Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Variante eines lipolytischen Ausgangsenzyms, wobei das Verfahren für das Kultivieren einer Wirtszelle wie

- der Detergensenzusammensetzung eingeschlossen sein, in Form eines nicht-staubenden Granulats, einer stabilisierten Flüssigkeit oder eines geschützten Enzyms. Nicht-staubende Granulate können gemacht werden, wie z. B. beschrieben in US 4,106,991 und 4,661,452 (beide an Novo Industry A/S) und können wahlweise durch im Stand der Technik bekannte Verfahren beschichtet werden. Beispiele für wachsig Beschichtungsmaterialien sind Poly(ethylenoxyd)produkte (Polyethylenglycol, PEG) mit mittleren Molekulargewichten von 1000 bis 20000; ethoxylierte Nonylphenole, die von 16 bis 50 Ethylenoxideinheiten haben; ethoxylierte Fettalkohle, in denen der Alkohol zwischen 12 bis 20 Kohlenstoffatome enthält und in denen 15 bis 80 Ethylenoxideinheiten sind; Fettalkohle; Fettsäuren; und Mono-, Di- und Triglyceride von Fettsäuren. Beispiele für filmbildende Beschichtungsmaterialien, die für das Anbringen durch Flüssig-Bett-Techniken (fluid bed techniques) geeignet sind, sind im Patent GB 1483591 gegeben. Flüssige Enzympräparationen können, z. B., durch die Zugabe eines Polyols, wie Propylenglycol, einem Zucker oder Zuckeralkohol, Milchsäure oder Borsäure nach etablierten Verfahren stabilisiert werden. Andere Enzymstabilisatoren sind im Stand der Technik gut bekannt. Geschützte Enzyme können nach dem in EP 238, 216 offenbarten Verfahren hergestellt werden.
- 20 Die erfindungsgemäße Detergensenzusammensetzung kann in jeder geeigneten Form sein, z. B. als Puder, Granulatkörner, Paste oder Flüssigkeit. Ein flüssiges Detergens kann wässrig, typischerweise bis zu 70 % Wasser und 0-30 % organisches Lösungsmittel enthaltend, oder nichtwässrig sein.
- 25 Die Detergensenzusammensetzung umfasst ein oder mehrere Tenside, wobei jedes einzelne davon anionisch, nicht-ionisch, kationisch oder zwitterionisch sein kann. Das Detergens wird üblicherweise 0-50 % eines anionischen Tensides enthalten, wie lineares Alkylbenzolsulfonat (LAS), Alphaolefinsulfonat (AOS), Alkylsulfat (Fettalkoholsulfat) (AS), Alkoholethoxysulfat (AEOS oder AES), sekundäre Alkylsulfonate (SAS), Alpha-Sulfo-Fettsäure-Methylester, Alkyl- oder Alkenylbernsteinsäure, oder Seife. Es kann auch 0-40 % an nichtionischem Tensid ent-
- 30

säure, Borsäure oder ein Borsäurederivat, wie, z. B., ein aromatischer Borsäureester, und die Zusammensetzung kann formuliert werden wie beschrieben in, z. B. WO 92/19709 und WO 92/19708.

- 5 Das Detergens kann auch andere konventionelle Detergensinhaltsstoffe enthalten, wie, z. B., Faserkonditionierer einschließlich Leime, Schaumförderer, Seifenschaumunterdrücker (suds suppressors), Anti-Korrosionsmittel, Schmutzlöser, Mittel, die die Schmutzablagerung verhindern (anti-soil-redeposition agents), Farbstoffe, Bakterizide, optische Aufheller oder Parfums.

10

Der pH (gemessen in wässriger Lösung bei Gebrauchskonzentration) wird üblicherweise neutral oder alkalisch sein, z. B. im Bereich von 7-11.

- Besondere Arten der Detergensenzusammensetzung, die im Bereich der Erfindung
15 sind, schließen ein:

(2) Eine Detergenezusammensetzung, als Granulat formuliert, mit einer Schüttdichte von zumindest 600 g/l enthaltend

Lineares Alkylbenzolsulfonat (berechnet als Säure)	6 – 11 %
Alkoholethoxysulfat (z. B. C ₁₂₋₁₈ Alkohol, 1-2 EO) oder Alkylsulfat (z. B. C ₁₆₋₁₈)	1 – 3 %
Alkoholethoxylat (z. B. C ₁₄₋₁₅ Alkohol, 7 EO)	5 – 9 %
Natriumkarbonat (als Na ₂ CO ₃)	15 – 21 %
lösliche Silikate (als Na ₂ O, 2SiO ₂)	1 – 4 %
Zeolit (als NaAlSiO ₄)	24 – 34 %
Natriumsulfat (als Na ₂ SO ₄)	4 – 10 %
Natriumcitrat / Zitronensäure (als C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ /C ₆ H ₈ O ₇)	0 – 15 %
Carboxymethylcellulose	0 – 2 %
Polymere (z. B. Maleinsäure/Acrylsäure Copolymer, PVP, PEG)	1 – 6 %
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1 %
Nebenbestandteile (z. B. Seifenschaumunterdrücker (suds suppressors), Parfüm)	0 – 5 %

(4) Eine Detergensenzusammensetzung, als Granulat formuliert, mit einer Schüttdichte von zumindest 600 g/l enthaltend

Lineares Alkylbenzolsulfonat (berechnet als Säure)	8 – 12 %
Alkoholethoxylat (z. B. C ₁₂₋₁₅ Alkohol, 7 EO)	10 – 25 %
Natriumkarbonat (als Na ₂ CO ₃)	14 – 22 %
lösliche Silikate (als Na ₂ O, 2SiO ₂)	1 – 5 %
Zeolit (als NaAlSiO ₄)	25 – 35 %
Natriumsulfat (als Na ₂ SO ₄)	0 – 10 %
Carboxymethylcellulose	0 – 2 %
Polymere (z. B. Maleinsäure/Acrylsäure Copolymer, PVP, PEG)	1 – 3 %
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1 %
Nebenbestandteile (z. B. Seifenschaumunterdrücker (suds suppressors), Parfüm)	0 – 5 %

(6) Eine wässrige, strukturierte, flüssige Detergensenzusammensetzung enthaltend

Lineares Alkylbenzolsulfonat (berechnet als Säure)	15 – 21 %
Alkoholethoxylat (z. B. C ₁₂₋₁₅ Alkohol, 7 EO oder C ₁₂₋₁₅ Alkohol, 5 EO)	3 – 9 %
Seife als Fettsäure (z. B. Ölsäure)	3 – 10 %
Zeolit (als NaAlSiO ₄)	14 – 22 %
Kaliumcitrat	9 – 18 %
Borat (als B ₄ O ₇)	0 – 2 %
Carboxymethylcellulose	0 – 2 %
Polymere (z. B. PEG, PVP)	0 – 3 %
Ankerpolymere, wie z. B. Laurylmethacrylat/Acrylsäurecopolymer; molares Verhältnis 25:1; MW 3800	0 – 3 %
Glyzerin	0 – 5 %
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1 %
Nebenbestandteile (z. B. Dispergenzien, Seifenschaumunterdrücker (suds suppressors), Parfüm, optische Aufheller)	0 – 5 %

(8) Eine Detergenezusammensetzung, als Granulat formuliert, umfassend

Lineares Alkylbenzolsulfonat (berechnet als Säure)	8 – 14 %
Ethoxyliertes Fettsäuremonoethanolamid	5 – 11 %
Seife als Fettsäure	0 – 3 %
Natriumkarbonat (als Na_2CO_3)	4 – 10 %
Lösliche Silikate (als Na_2O , 2SiO_2)	1 – 4 %
Zeolit (als NaAlSiO_4)	30 – 50 %
Natriumsulfat (als Na_2SO_4)	3 – 11 %
Natriumcitrat (als $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$)	5 – 12 %
Polymere (z. B. PVP, Maleinsäure/Acrylsäure Copolymer, PEG)	1 – 5 %
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1 %
Nebenbestandteile (z. B. Seifenschaumunterdrücker (suds suppressors), Parfüm)	0 – 5 %

(10) Eine wässrige, flüssige Detergensenzusammensetzung umfassend

Lineares Alkylbenzolsulfonat (berechnet als Säure)	15 – 23 %
Alkoholethoxysulfat (z. B. C ₁₂₋₁₅ Alkohol, 2-3 EO)	8 – 15 %
Alkoholethoxylat (z. B. C ₁₂₋₁₅ Alkohol, 7 EO oder C ₁₂₋₁₅ Alkohol, 5 EO)	3 – 9 %
Seife als Fettsäure (z. B. Laurylsäure)	0 – 3 %
Aminoethanol	1 – 5 %
Natriumcitrat	5 – 10 %
Hydrotrop (z. B. Natriumtoluolsulfonat)	2 – 6 %
Borat (als B ₄ O ₇)	0 – 2 %
Carboxymethylcellulose	0 – 1 %
Ethanol	1 – 3 %
Propylenglycol	2 – 5 %
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1 %
Nebenbestandteile (z. B. Polymere, Dispergentien, Parfüm, optische Aufheller)	0 – 5 %

(12) Eine Detergensenzusammensetzung, als Granulat formuliert, mit einer Schüttdichte von zumindest 600 g/l umfassend

Anionische Tenside (lineares Alkylbenzolsulfonat, Alkylsulfat, Alpha-Olefinsulfonat, Alphasulfosäuremethylester, Alkansulfonate, Seife)	25 – 40 %
Nichtionische Tenside (z. B. Alkoholethoxylat)	1 – 10 %
Natriumkarbonat (als Na_2CO_3)	8 – 25 %
lösliche Silikate (als Na_2O , 2SiO_2)	5 – 15 %
Natriumsulfat (als Na_2SO_4)	0 – 5 %
Zeolit (als NaAlSiO_4)	15 – 28 %
Natriumperborat (als $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0 – 20 %
Bleichaktivator (TAED oder NOBS)	0 – 5 %
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1 %
Nebenbestandteile (z. B. Parfüm, optische Aufheller)	0 – 3 %

5

(13) Detergensformulierungen wie beschrieben in 1) – 12), wobei das gesamte oder ein Teil des linearen Alkylbenzolsulfonats durch (C_{12} – C_{18}) Alkylsulfat ersetzt ist.

(15) Eine Detergensenzusammensetzung, als Granulat formuliert, mit einer Schüttdichte von zumindest 600 g/l umfassend

(C ₁₂ -C ₁₈) Alkylsulfat	4 – 8 %
Alkoholethoxylat	11 – 15 %
Seife	1 – 4 %
Zeolit MAP oder Zeolit A	35 – 45 %
Natriumcarbonat (als Na ₂ CO ₃)	2 – 8 %
Lösliches Silikat (als Na ₂ O, 2SiO ₂)	0 – 4 %
Natriumpercarbonat	13 – 22 %
TAED	1 – 8 %
Carboxymethylcellulose	0 – 3 %
Polymere (z. B. Polycarboxylate und PVP)	0 – 3 %
Enzyme (berechnet als reines Enzymprotein)	0,0001 – 0,1 %
Nebenbestandteile (z. B. optische Aufheller, Phosphonat, Parfüm)	0 – 3 %

- 5 (16) Detergenformulierungen wie beschrieben in 1) – 15), die eine stabilisierte oder eingekapselte Persäure enthalten, entweder als zusätzliche Komponente oder als Ersatz für bereits spezifizierte Bleichsysteme.

- 10 (17) Detergensenzusammensetzung wie beschrieben in 1), 3), 7), 9) und 12), wobei Perborat durch Percarbonat ersetzt ist.

- (18) Detergensenzusammensetzung wie beschrieben in 1), 3), 7), 9), 12), 14) und 15), die zusätzlich einen Mangankatalysator enthalten. Der Mangankatalysator kann, z. B., eine der Verbindungen sein, die beschrieben sind in "Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching", Nature 369, 1994, pp. 637-639.

- (19) Detergensenzusammensetzung, als nicht-wässrige Detergenflüssigkeit formuliert, umfassend ein flüssiges, nicht-ionisches Tensid, wie, z. B., linearen alkoxy-

Beispiele von geeigneten organischen Buildern schließen Alkalimetall, Ammonium und substituiertes Ammonium, Citrate, Succinate, Malonate, Fettsäuresulfonate, Carboxymetoxysuccinate, Ammoniumpolyacetate, Carboxylate, Polycarboxylate, Aminopolycarboxylate, Polyacetylcarboxylate und Polyhydroxysulphonate mit ein.

Andere geeignete organische Builder schließen die Polymere und Copolymere mit hohem Molekulargewicht mit ein, deren Bildeigenschaften bekannt sind, z. B. geeignete Polyacrylsäure, Polymaleinsäure und Polyacrylsäure/Polymaleinsäurecopolymere und ihre Salze.

Die Geschirrspüldetergensenzusammensetzung kann Bleichmittel des Chlor/Bromtyps oder des Sauerstofftyps enthalten. Beispiele von anorganischen Bleichmitteln des Chlor/Bromtyps sind Lithium-, Natrium- oder Calciumhypochlorit und Hypobromit sowie chloriniertes Trinatriumphosphat. Beispiele für organische Bleichmittel des Chlor/Bromtyps sind heterozyklische N-brom und N-chlorimide, wie Trichloroisocyanursäure, Tribromisocyanursäure, Dibromisocyanursäure und Dichlorisocyanursäure, und deren Salze mit, die Wasserlöslichkeit sicherstellenden, Kationen wie Kalium und Natrium. Hydantoinverbindungen sind auch geeignet.

Die Sauerstoffbleichen sind bevorzugt, z. B. in Form eines anorganischen Persalzes, bevorzugt mit einem Bleichmittelvorläufer oder als Peroxysäureverbindung. Typische Beispiele für geeignete Verbindungen als Peroxybleichen sind Alkalimetallperborate, sowohl Tetrahydrate als auch Monohydrate, Alkalimetallpercarbonate, Persilikate und Perphosphate. Bevorzugte Aktivatormittel sind TAED und Glycerintriacetate.

Die erfindungsgemäße Geschirrspüldetergensenzusammensetzung kann unter Verwendung von konventionellen Stabilisatoren für das Enzym / die Enzyme, z. B. ein Polyol, wie z. B. Propylenglycol, ein Zucker oder ein Zuckeralkohol, Milch-

„Tenside Surfactants Detergents“, 30 (1993), 6, pp 394-399; JAOCS, Vol. 61 (1984), 2, pp 367 – 376; EP 517 762; EP 123 400; WO 92/19714; WO 93/19147; US 5,082,578; EP 494 769; EP 544 493; EP 543 562; US 5,235,082; EP 568 297; EP 570 237.

5

Die Erfindung ist in den begleitenden Zeichnungen weiter beschrieben, wobei

Fig. 1 eine Restriktionskarte von pYESHL ist,

Fig. 2 eine Restriktionskarte des Plasmids pAO1 ist,

Fig. 3. eine Restriktionskarte des Plasmids pAHL ist, und

10 Figuren 4 und 5 die Konstruktion von Genen, die für erfindungsgemäße Varianten kodieren.

Die Erfindung ist weiter in den folgenden Beispielen beschrieben, die in keiner Weise dazu gedacht sind, den beanspruchten Bereich der Erfindung zu limitieren.

15

MATERIAL UND METHODEN

20 *Humicola lanuginosa* DSM 4109 erhältlich von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroderweg 1b, D-3300 Braunschweig, Bundesrepublik Deutschland.

pYESHL ist ein Hefe/*E. coli* Shuttlevektor, der eine geringe Menge der *H. lanuginosa* Lipase in Hefe exprimiert und sekretiert. Genauer gesagt ist pYESHL ein
25 Derivat von PYES2 (bezogen von Invitrogen Corp., UK), wobei der GAL1-Promotor ausgeschnitten wurde und das *Humicola lanuginosa* Lipasegen und TPI (Triosephosphatisomerase)-Promotor aus *S. cerevisiae* (Alber, T und Kawasaki, G., J.Mol.Appl. Genet 1, 419-434 (1982)) zwischen die SphI und XbaI Stellen kloniert wurden. Eine Restriktionskarte von pYESHL ist in Fig. 1 gezeigt.

30

benen entspricht, außer dass die in 5) definierte Lösung weiterhin 0,02% DobanolTM25-7 umfasst.

Konstruktion von Zufallsmutagenese Libraries

5 a) unter Verwendung eines gesamten, für eine Lipase kodierenden, Gens

Das Plasmid pYESHL wird mit 12 M Ameisensäure 20 Minuten lang bei Raumtemperatur behandelt. Das resultierende, für die Lipase kodierende, Gen wird vom Ameisensäure-behandelten Plasmid unter Verwendung von PCR unter mutagenen Bedingungen amplifiziert (0,5 mM MnCl₂ und 1/5 der normalen Menge an ATP, 10 siehe z. B. Leung et al., 1989).

Von dieser Behandlung erwartet man, dass sie ein breites Spektrum an Mutationen ergibt, weil Ameisensäure hauptsächlich Transversionen ergibt und PCR-generierte Mutationen hauptsächlich Transitionen.

15

Die resultierenden PCR-Fragmente werden entweder durch doppelte Rekombination (Muhlrad et al., 1992) *in vivo* in den Shuttlevektor kloniert oder durch Verdauung und Ligation in den Shuttlevektor und Transformation von *E. coli*.

20 Acht zufällig gepickte Klone wurden sequenziert, und man fand, dass sie 2-3 Mutationen im Durchschnitt enthielten – sowohl Transversionen als auch Transitionen.

25 Unter Verwendung dieses Verfahrens wurden sieben Librarys gemacht, die von 10.000 bis 140.000 Klone enthielten.

b) Durchführung von lokalisierter Zufallsmutagenese

Ein mutagener Primer (Oligonukleotid) wird synthetisiert, der den Teil der DNA-Sequenz, die mutagenisiert werden soll, entspricht, mit Ausnahme des Nukleotids 30 / der Nukleotide, die dem Aminosäurecodon / den Aminosäurecodons entsprechen, das/die mutagenisiert werden soll(en).

Für jede dieser Regionen wurde ein Oligonukleotid synthetisiert, das 93 % der Wildtyp-Nukleotide umfasste und 2,33 % von jedem der drei anderen Nukleotide, an den Aminosäurecodons, die man mutagenisieren wollte. Wo dies ohne Ändern der Aminosäure möglich war, wurde das dritte Nukleotid in Codons (die
5 „Wobble“-Base) mit 50 % G/50 %C synthetisiert, um eine größere Wahrscheinlichkeit für Veränderungen in Aminosäuren mit einem oder zwei Codons zu erhalten. Die Zusammensetzung der mutagenen Oligonukleotide der Region 91-97 ist in Tabelle 1 gezeigt.

- 10 Unter Verwendung dieses Oligonukleotids wird eine berechnete Mutationsfrequenz von ungefähr 65 – 70 % in der Library erhalten, dafür dass ein Aminosäureaustausch in die Ausgangslipase eingeführt wurde. Die Mutationsfrequenz dafür, dass zwei oder mehr Aminosäureaustausche eingeführt wurden, ist geringer als 35 %. Diese geringere Mutationsfrequenz wird gewählt, um sicherzustellen,
15 dass die in positiven Klonen beobachteten Aminosäureaustausche an der Verbesserung des Enzyms beteiligt sind und nicht nur „neutrale“ Austausche aufgrund einer hohen Mutationsfrequenz sind.

- Der mutagene Primer wurde in einer PCR-Reaktion zusammen mit einem geeigneten Gegenprimer verwendet. Die resultierenden PCR-Fragmente wurden aufgereinigt und im Fall der Region 206-211 verdaut und in den Shuttlevektor kloniert.
20 Im Fall der Region 91-97 wurde das resultierende PCR-Fragment in einer zweiten PCR-Reaktion als Primer verwendet, zusammen mit einem zweiten geeigneten Gegenprimer. Dieser Schritt war nötig, um in der Lage zu sein, die mutagenisierte
25 Region zu verdauen und in den Shuttlevektor zu klonieren.

- Libraries der Region 91-97 und der Region 206-211 wurden hergestellt, die von 10.000 bis 80.000 Klone pro Library enthalten. Die meisten Kolonien waren positiv (mehr als 90 %), wenn sie unter Bedingungen getestet wurden, bei denen die
30 Ausgangslipase positiv ist, d. h. Lipaseaktivität aufweist. Die positive Reaktion wurde in einem Filterassay mit 2,5 mM Ca (anstatt 5 mM EGTA) festgestellt.

Tabelle 1:

Sequenz:

5'	5	C	G
T	5	C	3'
T	7	A	
A	8	G	<u>Flasche 5:</u> 93 % A; 2,33 % C; 2,33 % G und 2,33 % T
T	8	T	
T	A/C	T	
T	5	C	
C	7	T	
T	5	C	<u>Flasche 6:</u> 93 % C; 2,33 % A; 2,33 % G und 2,33 % T
T	8	T	
T	8	A	
6	C/G	T	
5	6	G	<u>Flasche 7:</u> 93 % G; 2,33 % A; 2,33 % C und 2,33 % T
5	6	G	
7	G	A	
8	AA	A	
6	T	C	<u>Flasche 8:</u> 93 % T; 2,33 % A; 2,33 % C und 2,33 % G
7			

5

Tabelle 1: Erklärung der Konstruktion von Oligonukleotiden, wie sie zur lokalisierten Zufallsmutagenese von Aminosäuren 91-97 der *H. lanuginosa* Lipase verwendet wurden. Die in der Sequenz gezeigten Zahlen beziehen sich auf die Flaschen, deren Zusammensetzung rechts von der Sequenz erscheint.

10

Tabelle 3

Stamm num- mer	Varian- tentyp	DNA-Sequenz										
		(Nummer der Aminosäure ist über der Sequenz)										
wt		82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92
		GGC	TCT	CGT	TCC	ATA	GAG	AAC	TGG	ATC	GGG	AAT
59	I										C	
60	II		A								C	
61	II		A								C	
62	III						A				C	
63	IV						A				C	
64	II		A								C	
65	III						A				C	
67	V										C	
52/68	wt											
53	wt											
69	V										C	
71	III						A				C	
72	II		A								C	
73	VI											

D167G+E210V

5mM EGTA; 0,01 % DobanolTM25-7; 0,006 % LAS

E87K+G91A+L93I+N94K+D96A

5

5mM EGTA; 0,02 % DobanolTM25-7

N73D+S85T+E87K+G91A+N94K+D96A

S83T+E87K+W89G+G91A+N94K+D96V

E87K+G91A+D96R+I100V

10 S83T+E87K+Q249R

E87K+G91A

BEISPIEL 3

Expression der *Humicola lanuginosa* Lipase in *Aspergillus oryzae*

- 15 Die Klonierung der *Humicola lanuginosa* Lipase ist in EP 305 216 beschrieben. Dort ist auch die Expression und Charakterisierung der Lipase in *Aspergillus oryzae* beschrieben. Das verwendete Expressionsplasmid wird p960 genannt.

- 20 Das in dieser Anmeldung verwendete Expressionsplasmid ist identisch mit p960, mit Ausnahme von untergeordneten Modifikationen knapp 3' von der für die Lipase kodierenden Region. Die Modifikationen wurden auf die folgende Art gemacht: p960 wurde mit den Restriktionsenzymen NruI und BamHI verdaut. Zwischen diese beiden Stellen wurde das BamHI/NheI Fragment aus dem Plasmid pBR322, bei dem das NheI Fragment mit Klenowpolymerase aufgefüllt worden war, kloniert und somit das Plasmid pAO1 erzeugt (Figur 2), das einmalige BamHI und NheI Stellen enthält. Zwischen diesen einmaligen Stellen wurden die BamHI/XbaI Fragmente aus p960 kloniert und damit ein pAHL erzeugt (Figur 3).
- 25

Ortsspezifische in vitro Mutagenese des Lipasegens

- 30 Der Weg, der für das Einführen von Mutationen in das Lipasegen verwendet wurde, ist in Nelson & Long, Analytical Biochemistry, 180, 147-151 (1989) beschrieben.

ATCGGC-3'

PCR Helfer 2 (= C): 5' -CCATGGCTTTCACGGTGTCT-3'

PCR Handle (= D): 5' -GGTCATCCAGTCACTGAGAC-3'

Helfer 1 und Helfer 2 sind komplementär mit Sequenzen außerhalb der kodierenden Region und können darum in Kombination mit jedem beliebigen Mutageneseprimer für die Konstruktion der Sequenz einer Variante verwendet werden.

5

Alle 3 Schritte werden durchgeführt im folgenden Puffer, enthaltend: 10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,001 % Gelatine; 0,2 mM dATP; 0,2 mM dCTP; 0,2 mM dGTP; 0,2 mM TTP; 2,5 Einheiten Tag Polymerase.

In Schritt 1 werden 100 pmol Primer A, 100 pmol Primer B und 1 fmol linearisiertes Plasmid einem Reaktionsgemisch mit einem Gesamtvolumen von 100 µl gegeben und 15 Zyklen bestehend aus 2 Minuten bei 95°C, 2 Minuten bei 37°C und 3 Minuten bei 72°C werden durchgeführt.

Die Konzentration des PCR-Produkts wird auf einem Agarosegel geschätzt. Dann wird Schritt 2 durchgeführt. 0,6 pmol des Produkts aus Schritt 1 und 1 fmol linearisiertes Plasmid sind in einem Gesamtvolumen von 100 µl des vorher genannten Puffers eingeschlossen und 1 Zyklus bestehend aus 5 Minuten bei 95°C, 2 Minuten bei 37°C und 10 Minuten bei 72°C werden durchgeführt.

Zur Reaktionsmischung aus Schritt 2 wird 100 pmol Primer C und 100 pmol Primer D gegeben (je 1 µl) und 20 Zyklen bestehend aus 2 Minuten bei 95°C, 2 Minuten bei 37°C und 3 Minuten bei 72°C werden durchgeführt. Diese Arbeitsweise stellte Schritt 3 im Mutageneseverfahren dar.

25 Isolation des mutierten Isolationsfragments

Das Produkt aus Schritt 3 wird aus einem Agarosegel isoliert und 20 µl H₂O wieder gelöst. Dann wird es mit den Restriktionsenzymen BamHI und BstXI in einem

pAHLE87K/D96V TCCAGTTCTCTATGGAACGAGTGCCACGGAAAGA-3'
 5' -TATTTCTTTCAAACGAAGTTAAGATTCCCGATCC-
 AGTTCTTTATGGAACGAGA-3'
 pAHLE87K/G91A/D96A 5' -TATTTCTTTCAAAGCGAAGTTAAGATTAGCGATC-
 CAGTTCTTTATGGAACGAGA-3'
 pAHLN94K/F95L/D96H 5' -TATTTCTTTCAAGTGCAACTTAAGATTCCCGAT-3'
 pAHLF95C/D96N 5' -TATTTCTTTCAAGTTACAGTTAAGATTCCC-3'
 pAHLG91S/L93V/F95C 5' -TATTTCTTTCAAGTCACAGTTAACATTAGAGATCC-
 AGTTCTC-3'
 pAH- 5' -TATTTCTTTCAAAGCGAACTTAATATTAGCGATC-
 LE87K/G91A/L93I/N94 CAGTTCTTTATGGAACGAGA-3'
 K/D96A
 pAHL D167G 5' -ATATGAAAACACACCGATATCATACCC-3'
 pAHLA121V 5' -CCTTAACGTATCAACTACAGACCTCCA-3'
 pAHLR205K/E210Q 5' -GCTGTAACCGAATTGGCGCGGCGGGAGCTTAGGG-
 ACAATATC-3'
 pAHLN73D/S85T/E87K/ 5' -TATTTCTTTCAAAGCGAACTTAAGATTAGCGATC-
 G91A/N94K/D96A CAGTTCTTTATAGTACGAGAGCCACGGAA
 AGAGAGGACGATCAATTTGTCCGTGTTGTGCGAG-3'
 pAHL S83T/E87K/W89G 5' -TATTTCTTTCAAACGAAGTTAAGATTAGCGATA-
 /G91A/N94K/D96V CCGTTCTTTATGGAACGAGTGCCACGGAAAGA-3'
 pAH- 5' -GCAAATGTCATTAAGTTCTTTCAATCTGAAGTTAA-
 LE87K/G91A/D96R/110 GATTAGCGATCCAGTTCTTTATGGAACGAGA-3'
 0V
 pAHL S83T/E87K 5' -CCCGATCCAGTTCTTTATGGAACGAGTGCCACGG-
 AAAGA-3'
 pAHLE87K/G91A 5' -GAAGTTAAGATTAGCGATCCAGTTCTTTATGGAA-
 CGAGA-3'
 pAHL S83T/E87K 5' -CCCGATCCAGTTCTTTATGGAACGAGTGCCACGG-
 AAAGA-3'
 pAHLQ249R 5' -CGGAATGTTAGGTCTGTTATTGCCGCC-3'

Die Suspension wird durch ein Miratuch (miracloth) filtriert, das Filtrat in einen sterilen Behälter überführt und mit 5 ml 0,6 M Sorbitol, 100 mM Tris-HCl, pH = 7,0 überschichtet. Zentrifugation wird bei 1000 g 15 Minuten lang durchgeführt und die Protoplasten von der Oberfläche des MgSO₄ Kissens gesammelt. 2 Volumen
5 STC (1,2 M Sorbitol, 10 mM Tris-HCl, pH = 7,5, 10 mM CaCl₂) werden zur Protoplastensuspension zugegeben und die Mischung bei 1000 g 5 Minuten lang zentrifugiert. Das Protoplastensediment wird in 3 ml STC resuspendiert und wieder sedimentiert. Das wird wiederholt. Schließlich werden die Protoplasten in 0,2
10 ~ 1 ml STC resuspendiert.

100 µl der Protoplastensuspension werden mit 5 – 25 µg p3SR2 gemischt (ein Plasmid, das ein A. nidulans amdS Gen prägt; beschrieben in Hynes et al., Mol. and Cel. Biol., Vol. 3, No. 8, 1430 – 1439, Aug. 1983) in 10 µl STC. Die Mischung
15 wird 25 Minuten lang auf Raumtemperatur gehalten. 0,2 ml 60 % PEG 4000 (BDH 29576), 10 mM CaCl₂ und 10 mM Tris-HCl, pH = 7,5 wird zugegeben und vorsichtig gemischt (zweimal) und schließlich werden 0,85 ml derselben Lösung zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Mischung wird 25 Minuten lang auf Raumtemperatur gehalten, bei 2500 g 15 Minuten lang zentrifugiert und das
20 Pellet in 2 ml 1,2 M Sorbitol resuspendiert. Nach einer weiteren Sedimentation werden die Protoplasten auf Minimalplatten (Cove, Biochem. Biophys. Acta 113 (1966) 51-56) enthaltend 1,0 M Saccharose, pH = 7,0, 10 mM Acetamid als Stickstoffquelle und 20 mM CsCl, um Hintergrundwachstum zu verhindern, verteilt. Nach einer Inkubation von 4 – 7 Tagen bei 37°C werden Sporen gepickt, in steri-
25 lem Wasser suspendiert und verteilt, um einzelne Kolonien zu erhalten. Dieses Verfahren wird wiederholt und Sporen einer einzelnen Kolonie, nach der zweiten Reisolation, werden als definierte Transformanten gelagert.

30 **Expression von Analoga der Lipase in *A. oryzae***

Puffer pH 7 equilibriert worden war. Wasche die Säule mit demselben Puffer, bis die Absorption bei 280 nm geringer als 0,05 OD ist. Eluiere die gebundene Enzymaktivität mit einem linearen Salzgradienten im selben Puffer (0 bis 0,5 M NaCl) unter Verwendung von fünf Säulenvolumen. Vereinige die Fraktionen, die Enzymaktivität enthalten.

Schritt 3: -Hydrophobe Chromatografie. Stelle die Molarität der vereinigten Fraktionen, die Enzymaktivität enthalten, auf 0,8 M ein, durch Zugabe von festem Ammoniumacetat. Appliziere das Enzym auf eine TSK Gel Butyl-Toyopearl 650 C Säule (erhältlich von Tosoh Corporation Japan), die mit 0,8 M Ammoniumacetat vorequibriert worden war. Wasche das ungebundene Material mit 0,8 M Ammoniumacetat und eluiere das gebundene Material mit destilliertem Wasser.

Schritt 4: - Der Pool enthaltend die Lipaseaktivität wird mit Wasser verdünnt, um die Leitfähigkeit auf 2 mS und den pH auf 7 einzustellen. Appliziere die vereinigten Fraktionen auf eine „High performance Q Spharose“ (Pharmacia) Säule, die mit 50 mM Tris-Acetatpuffer pH 7 präequibriert worden war. Eluiere das gebundene Enzym mit einem linearen Salzgradienten.

20

BEISPIEL 8

Die Waschleistung von erfindungsgemäßen Lipasevarianten

Die Waschleistung von erfindungsgemäßen *Humicola lanuginosa* Lipasevarianten wurde bewertet auf Grundlage der Enzymdosierung in mg Protein pro Liter, gemäß dem OD₂₈₀, im Vergleich mit der Wildtyp *H. lanuginosa* Lipase.

Waschversuche wurden in 150 ml Bechergläsern durchgeführt, die in ein thermostatreguliertes Wasserbad platziert wurden. Die Bechergläser wurden mit dreieckigen magnetischen Rührfischen gerührt.

Ergebnisse:

Dosis-Wirkungskurven für die Lipasevarianten und die native H. lanuginosa Lipase wurden verglichen. Die Dosis-Wirkungskurven wurden berechnet, indem die gemessenen Daten an die folgende Gleichung angepasst wurden:

5

$$\Delta R = \Delta R_{\max} \frac{C^{0,5}}{K + C^{0,5}} \quad (I)$$

wobei ΔR der Effekt ausgedrückt in Einheiten des Reflektionsgrads ist,

10 C ist die Enzymkonzentration (mg/l)

ΔR_{\max} ist eine Konstante, die den Maximaleffekt ausdrückt

K ist eine Konstante; K^2 drückt die Enzymkonzentration aus, bei der Hälfte des Maximaleffekts erhalten wird.

15 Basierend auf den charakteristischen Konstanten ΔR_{\max} und K, die für jede Lipasevariante sowie für die Wildtypipase bestimmt wurden, wurden Verbesserungsfaktoren berechnet. Der Verbesserungsfaktor, definiert als

$$f_{\text{Verbesserung}} = C_{WT}/C \quad (II)$$

20

drückt die Menge an Protein der Lipasevariante aus, die man braucht, um denselben Effekt zu erhalten, wie mit 0,25 mg/l des Referenzwildtypproteins (C_{WT}).

Damit war das Verfahren zur Berechnung des Verbesserungsfaktors wie folgt:

25

1) Der Effekt des Wildtypproteins bei 0,25 mg/l ($\Delta R_{(wildtyp)}$) wurde unter Verwendung von Gleichung (I) berechnet;

2) Die Konzentration der Lipasevariante, die denselben Effekt ergab wie der Wildtyp bei 0,25 mg/l wurde berechnet unter Verwendung der folgenden Gleichung:

30

07.11.02

-68-

Tabelle 1

Variante	Verbesserungsfaktor
E87K + D96 V	1,2
S83T + N94K + D96N	2,3
N94K + D96A	2,7
E87K + G91A + D96A	2,6
N94K + F95L + D96H	3,3
D167G + E210V	5,0
E87K + G91A + L93I + N94K + D96A	1,3
E87K + G91A + D96R + I100V	5,2
E87K + G91A	5,0
N73D + E87K + G91A + N94I + D96G	1,3
S83T + E87K + G91A + N92H + N94K + D96M	3,8
K46R + E56R + G61S	1,9
D102K	0,2
D167G	1
N73D + E87K + G91A + N94I + D96G	1,3
E210R	2,7
E210K	5,5
E210W	1
N251W + D254W + T267W	0,8
S83T + E87K + G91A + N92H + N94K + D96M	3,8
E56R + I90F + D96L + E99K	4,8
D57G + N94K + D96L + L97M	1,9

- J. O. Deshler, (1992) A simple method for randomly mutating cloned DNA fragments by using chemical mutagens and the polymerase chain reaction. *GATA* 9(4): 103 – 106
- 5 Leung et al., *Technique*, Vol. 1, No. 1, pp. 11 – 15, 1989
- Fowler et al., *Molec. gen. Genet.*, 133, pp. 179 – 191, 1974
- 10 Brady et al., „A Serine Protease Triad Forms the Catalytic Centre of a Triacylglycerol Lipase“, *Nature* 343, 1990, pp. 767 – 770, 1990.
- Tilbeygh, H. van, Egloff, M.-P., Martinez, C., Rugani, N., Verger, R. and Cambillau (1993) *Nature* 362, p. 814 – 820. Interfacial activation of the lipase-lipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography.
- 15 Hudson et al., *Practical Immunology*, Third edition, Blackwell Scientific Publications, 1989
- 20 Alber, T. and Kawasaki, G., *J. Mol. Appl. Genet* 1, 419 – 434 (1982)

07-1102

-2-

	ATG AGG AGC TCC CTT GTG CTG TTC TTT GTC TCT GCG TGG ACG GCC TTG	48
	Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu	
	-20 -15 -10	
5	GCC AGT CCT ATT CGT CGA GAG GTC TCG CAG GAT CTG TTT AAC CAG TTC	96
	Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe	
	-5 1 5 10	
10	AAT CTC TTT GCA CAG TAT TCT CCA GCC GCA TAC TGC GGA AAA AAC AAT	144
	Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn	
	15 20 25	
15	GAT GCC CCA GCT GGT ACA AAC ATT ACG TGC ACG CGA AAT CCC TCC CCC	192
	Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro	
	30 35 40	
20	GAG GTA GAG AAG GCG GAT GCA ACG TTT CTC TAC TCG TTT GAA GAC TCT	240
	Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser	
	45 50 55	
25	GGA GTG GGC GAT GTC ACC GGC TTC CTT GCT CTC GAC AAC ACG AAC AAA	288
	Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys	
	60 65 70	
30	TTG ATC GTC CTC TCT TTC CGT GGC TCT CGT TCC ATA GAG AAC TCG ATC	336
	Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile	
	75 80 85 90	
35	GCG AAT CTT AAC TTC GAC TTG AAA GAA ATA AAT GAC ATT TGC TCC GGC	384
	Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly	
	95 100 105	
40	TGC AGC GGA CAT GAC GGC TTC ACT TCG TCC TGG AGG TCT GTA GCC GAT	432
	Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp	
	110 115 120	
45	ACG TTA AGC CAG AAG GTG GAG GAT GCT GTG AGC GAG CAT CCC GAC TAT	480
	Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr	
	125 130 135	
50	CCG GTG GTG TTT ACC GGA CAT AGC TTG GGT GGT CCA TTC GCA ACT GTT	528
	Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val	
	140 145 150	
55	GCC GGA GCA GAC CTG CGT GGA AAT GCG TAT GAT ATC GAC GTG TTT TCA	576
	Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser	
	155 160 165 170	
60	TAT GGC GCC CCC CGA GTC GGA AAC AGG GCT TTT GCA GAA TTC CTG ACC	624
	Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr	
	175 180 185	
65	GTA CAG ACC GGC GGA ACA CTC TAC CCG ATT ACC CAC ACC AAT GAT ATT	672
	Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile	
	190 195 200	
70	GTC CCT AGA CTC CCG CCG CGC GAA TTC GGT TAC AGC CAT TCT AGC CCA	720
	Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro	
	205 210 215	
75	GAG TAC TGG ATC AAA TCT GGA ACC CTT GTC CCC GTC ACC CGA AAC GAT	768
	Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp	
	220 225 230	
80	ATC GTG AAG ATA GAA GGC ATC GAT GCC ACC GGC GGC AAT AAC CAG CCT	816
	Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro	
	235 240 245 250	
85	AAC ATT CCG GAT ATC CCT GCG CAC CTA TGG TAC TTC GGG TTA ATT GCG	864

NZAS-0018453

07.11.02

-4-

Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro
235 240 245 250

Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly
255 260 265

Thr Cys Leu

Expression der mutierten DNA-Sequenz erlauben, und Kultivierung der in Schritt b) erhaltenen Wirtszelle unter für die Expression der mutierten DNA-Sequenz geeigneten Bedingungen.

- 5 6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die für die Expression der mutierten DNA-Sequenz verwendete Wirtszelle eine mikrobielle Zelle ist.
7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Wirtszelle eine Zelle eines Pilz- oder Bakterienstammes ist.
- 10 8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Wirtszelle eine Zelle des Genus *Aspergillus*, wie *A. niger*, *A. oryzae* und *A. nidulans*, oder eine Zelle des Genus *Saccharomyces*, z.B. *S. cerevisiae*, ist.
- 15 9. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Wirtszelle eine Zelle eines Gram-positiven Bakterienstammes ist, z.B. des Genus *Bacillus*, wie *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus thuringiensis* oder *Streptomyces*
- 20 *lividans* oder *Streptomyces murinus*, oder eine Zelle eines Gram-negativen Bakterienstammes, wie *E. coli*, ist.
10. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das mutierte lipolytische Enzym eine verbesserte Toleranz gegenüber einem nicht-ionischen, anionischen, kationischen, zwitterionischen oder amphotherischen Tensid hat.
- 25 11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das nicht-ionische Tensid ein Alkoholethoxylat und/oder das anionische Tensid LAS oder ein Alkylsulfat ist.

20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei das lipolytische Ausgangsenzym eine Lipase ist und die DNA-Sequenz, die für die Ausgangslipase kodiert, erhältlich ist von einem Stamm von *H. lanuginosa*, z.B. den *H. lanuginosa* Stamm DSM 4109, einem Stamm von *Rh. mucor*, oder einem Stamm von *C. antarctica*.
21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei die der Zufallsmutagenese unterzogene DNA-Sequenz kodiert für zumindest eine der Regionen definiert durch die Aminosäurereste 21-27, 56-64, 81-99, 108-116, 145-147, 174, 202-213, 226-227, 246-259, oder 263-269 der *H. lanuginosa* Lipase erhältlich von DSM 4109.
22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei die lokalisierte Zufallsmutagenese in zumindest zwei der genannten Regionen durchgeführt wird.
23. Verfahren nach Anspruch 17, wobei das lipolytische Ausgangsenzym von einem Bakterium erhältlich ist.
24. Verfahren nach Anspruch 23, wobei die DNA-Sequenz, die das lipolytische Ausgangsenzym kodiert, erhältlich ist von einem Stamm von *Pseudomonas* spp., wie *P. cepacia*, *P. alcaligenes*, *P. pseudolocaligens* oder *P. fragi* oder von einem Stamm von *Bacillus*.
25. Variante der *H. lanuginosa* Lipase, erhältlich von DSM 4109, die zumindest eine der folgenden Mutationen umfasst: S83T, G91A, I100V, D167G, und die wahlweise weiterhin umfasst die Addition von einer oder mehreren Aminosäureresten an entweder das N- oder C-terminale Ende der Lipase, oder an beide, die Substitution von einer oder mehreren Aminosäureresten an einer oder mehreren verschiedenen Stellen in der Aminosäuresequenz, Deletion von einer oder mehreren Aminosäureresten an einem oder an beiden Enden der Lipase oder an einer oder mehreren Stellen in der Aminosäuresequenz oder In-

und die wahlweise zusätzlich die Addition von einem oder mehreren Aminosäureresten an entweder das N- oder das C-terminale Ende der Lipase, oder an beide, umfasst, Substitution von einer oder mehreren Aminosäureresten an einer oder mehreren verschiedenen Stellen in der Aminosäuresequenz, Deletion von einer oder mehreren Aminosäureresten an einem oder beiden Enden der Lipase oder an einer oder mehreren Stellen in der Aminosäuresequenz oder Insertion von einem oder mehreren Aminosäureresten an einer oder mehreren Stellen in der Aminosäuresequenz, vorausgesetzt, dass die Variante Lipaseaktivität behält.

10

27. DNA-Konstrukt kodierend für eine *H. lanuginosa* Lipasevariante nach Anspruch 25 oder 26.

28. Vektor beinhaltend ein DNA-Konstrukt nach Anspruch 27.

15

29. Vektor nach Anspruch 28, der ein Plasmid oder ein Bakteriophage ist.

30. Vektor nach Anspruch 28 oder 29, der ein Expressionsvektor ist, der weiterhin DNA-Sequenzen, die die Expression der Variante des lipolytischen Ausgangsenzyms gestatten, umfasst.

20

31. Wirtszelle beinhaltend ein DNA-Konstrukt nach Anspruch 27 oder ein Vektor nach irgendeinem der Ansprüche 28 bis 30.

25

32. Zelle nach Anspruch 31, die eine mikrobielle Zelle ist.

33. Zelle nach Anspruch 32, die eine Zelle eines Pilz- oder Bakterienstammes ist.

30

34. Zelle nach Anspruch 33, die eine Zelle des Genus *Aspergillus* ist, wie *A. niger*, *A. oryzae* oder *A. nidulans*, oder eine Zelle des Genus *Saccharomyces*, z.B. *S. cerevisiae*.

40. Detergensadditiv nach Anspruch 38 oder 39, das zusätzlich ein weiteres Enzym wie eine Protease, Amylase, Peroxidase, Cutinase, Lipase und/oder Cellulase umfasst.

5

41. Detergengzusammensetzung umfassend eine Lipasevariante nach Anspruch 25 oder 26.

10

42. Detergengzusammensetzung nach Anspruch 41, die zusätzlich ein weiteres Enzym wie eine Protease, Amylase, Peroxidase, Cutinase, Lipase und/oder Cellulase umfasst.

07.11.00

2/5

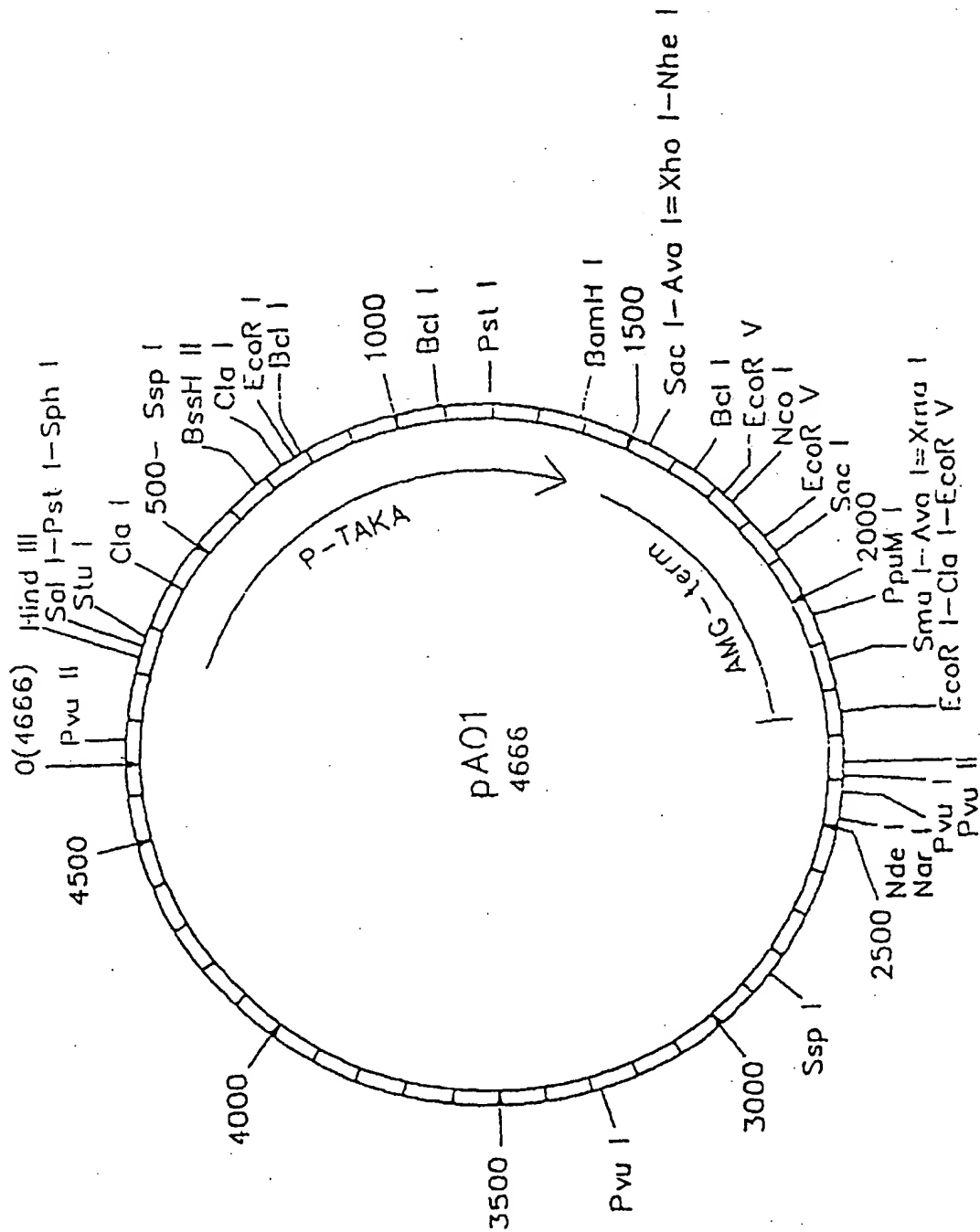


Fig. 2

07.11.02

4/5

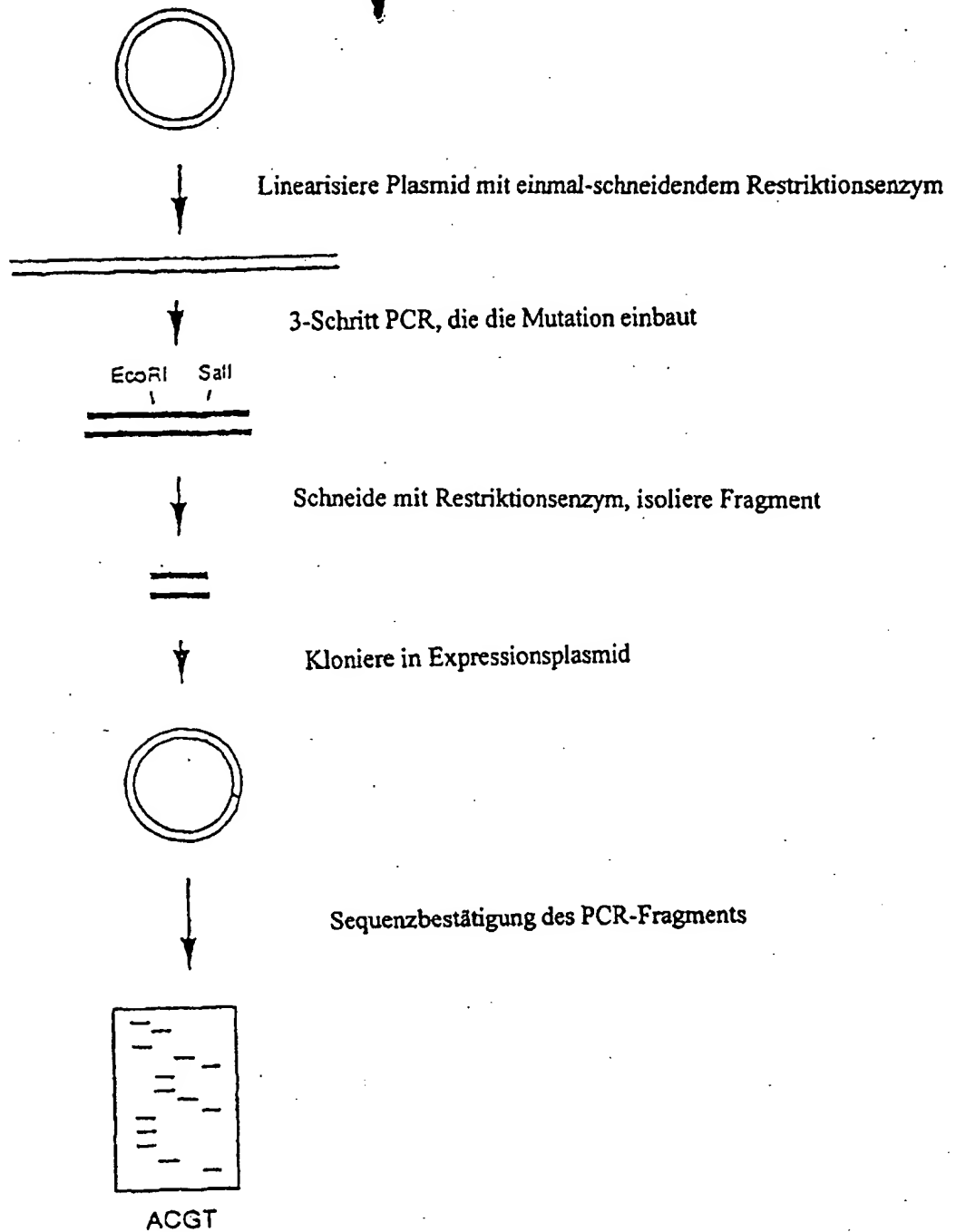


Fig. 4

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.